

First Hit

L5: Entry 1 of 2

File: JPAB

Aug 9, 1994

PUB-NO: JP406220008A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 06220008 A

TITLE: METHOD FOR PRODUCING ALLIIN

PUBN-DATE: August 9, 1994

## INVENTOR-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

UCHIYAMA, SHIGERU

ONiyAMA, KAZUHIKO

SEKI, MASAO

YAMASHITA, MASATADA

## ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

ISHIKAWAJIMA HARIMA HEAVY IND CO LTD

APPL-NO: JP05010239

APPL-DATE: January 25, 1993

US-CL-CURRENT: 562/557

INT-CL (IPC): C07C 317/48; C07C 315/06

## ABSTRACT:

PURPOSE: To easily and efficiently purify alliin found in garlic as raw material, without degradation thereof by efficient extraction and using a liquid chromatography with a reversed-phase-based column.

CONSTITUTION: The aimed alliin can be obtained from garlic as raw material through the following consecutive processes in this order: (1) heat treatment of raw material garlic is conducted in hot water so as to deactivate the alliinase contained in the garlic, (2) the garlic heat treated is crushed followed by addition of water to make a crude extract solution from the garlic, (3) this solution is put to a liquid chromatography with a reversed-phase-based column to separate, purify and dispense the aimed alliin.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&amp;Japio

First Hit

## End of Result Set

L5: Entry 2 of 2

File: DWPI

Aug 9, 1994

DERWENT-ACC-NO: 1994-290869

DERWENT-WEEK: 199436

COPYRIGHT 2005 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Prepn. of alliin, as precursor to allithiamin having e.g. bactericidal action - comprises boiling garlic to deactivate allinase, crushing and extracting alliin, sepg. and purifying in reversed phase column

## PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE

CODE

ISHIKAWAJIMA HARIMA HEAVY IND

ISHI

PRIORITY-DATA: 1993JP-0010239 (January 25, 1993)

Search Selected

Search ALL

Clear

## PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
<input type="checkbox"/> JP 06220008 A	August 9, 1994		007	C07C317/48

## APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	DESCRIPTOR
JP 06220008A	January 25, 1993	1993JP-0010239	

INT-CL (IPC): C07C 315/06; C07C 317/48

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 06220008A

## BASIC-ABSTRACT:

Prepn. of alliin comprises: (a) heat-treating garlic in a hot water to deactivate allinase in garlic; (b) crushing the heat-treated garlic and adding with water to extract alliin; and (c) sepg. and purifying alliin from the extract by liq. chromatography using a reversed phase column.

The extract is subjected to liq. chromatography while maintaining under an inert gas.

USE/ADVANTAGE - Alliin is a precursor for allithiamin having various pharmacological effects such as bactericidal action, stomach action, perspiration action etc. The prepn. can efficiently and stably separate and purify alliin from garlic by liq. chromatography.

In an example, the husk of garlic bulbs was peeled, and garlic was weighed and boiled in water for 15 min and homogenised at 10,000 rpm for 1 min. The homogenised product was filtered with a filter paper and the filtrate was diluted with distilled water to 100 ml to form an extract which was stored at 4 deg.C or lower

in the dark. The extract was subjected to liq. chromatography (HPLC system PX-8010, RTM to separate alliin, where, temp.-25 deg.C; flow rate=0.5 ml/min; Eluent=water, column=ZORBAX TMS (9.4mmx25cm), and UV detector (210 nm).

CHOSEN-DRAWING: Dwg. 0/9

TITLE-TERMS: PREPARATION PRECURSOR BACTERIA ACTION COMPRISE BOILING GARLIC  
DEACTIVATE CRUSH EXTRACT SEPARATE PURIFICATION REVERSE PHASE COLUMN

DERWENT-CLASS: B05

CPI-CODES: B10-B02D; B14-A01;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M2 \*01\*

Fragmentation Code

C216 H1      H100 H181 H7      H721 J0      J011 J1      J171

K0      K4      K442 M210 M213 M231 M271 M281 M312 M321

M332 M343 M349 M381 M391 M416 M720 M903 M904 N161

N480 N511 N512 P220

### Specific Compounds

13350P

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1994-132620

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-220008

(43)Date of publication of application : 09.08.1994

---

(51)Int.Cl.

C07C317/48  
C07C315/06

---

(21)Application number : 05-010239

(71)Applicant : ISHIKAWAJIMA HARIMA HEAVY  
IND CO LTD

(22)Date of filing : 25.01.1993

(72)Inventor : UCHIYAMA SHIGERU  
ONiyAMA KAZUHIKO  
SEKI MASAO  
YAMASHITA MASATADA

---

### (54) METHOD FOR PRODUCING ALLIIN

#### (57)Abstract:

PURPOSE: To easily and efficiently purify alliin found in garlic as raw material, without degradation thereof by efficient extraction and using a liquid chromatography with a reversed-phase-based column.

CONSTITUTION: The aimed alliin can be obtained from garlic as raw material through the following consecutive processes in this order: (1) heat treatment of raw material garlic is conducted in hot water so as to deactivate the alliinase contained in the garlic, (2) the garlic heat treated is crushed followed by addition of water to make a crude extract solution from the garlic, (3) this solution is put to a liquid chromatography with a reversed-phase-based column to separate, purify and dispense the aimed alliin.

---

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

\* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The process of the alliin characterized by having the process heat-treated so that deactivation of the alliinase which puts in a raw material garlic into hot water, and contains it may be carried out, the process which crushes the heat-treated garlic, adds water and produces a garlic crude extract, and the process which carries out separation purification of the alliin and is isolated preparatively out of the above-mentioned garlic crude extract with the liquid chromatography using an opposition system column.

[Claim 2] The process of the alliin according to claim 1 characterized by performing the above-mentioned preparative isolation process, holding the above-mentioned garlic crude extract under an inert gas ambient atmosphere.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

**[Detailed Description of the Invention]****[0001]**

**[Industrial Application]** This invention relates to the process of the alliin which is the useful matter contained in a garlic, and relates to the technique of separating and refining alliin easily efficiently from a garlic cell.

**[0002]**

**[Description of the Prior Art]** Allithiamin is in one of the most important matter in the matter produced in the cell of a garlic. This allithiamin is compounded from the alliin contained in a garlic cell. That is, the alliin of this precursor serves as allysine of an intermediate product according to an operation of enzyme alliinase, and allithiamin is further compounded by operation of allithiamin synthetic enzyme from allysine and a thiamine (vitamin-B1 thiol mold).

**[0003]** Allithiamin \*\* antibacterial operation: acute and chronic transmissible gastroenteritis, dysentery, Germicidal actions, such as typhoid fever, \*\* stomachic operation : Stomachic and ready intestines operations, such as better appetite and digestive promotion, An extermination-of-harmful-insects operation, \*\* circulatory system operation : Validity [ arteriosclerosis, hypertension, and oversensitivity to cold ], \*\* Perspiration : since it has the perspiration at the time of generation of heat, \*\*\*\* and urination hardening and a detoxifying effect, and \*\* sthenia and a strong energy operation: flesh fatigue restorative effect, having the pharmacology effectiveness which was [ be / it / effective against sthenia and strong energy, and ocular fatigue ] excellent is known, and the use increase is achieved.

**[0004]**

**[Problem(s) to be Solved by the Invention]** In order to produce this allithiamin from a garlic efficiently, the cultivation which produces allithiamin from a garlic cultured cell is being examined. In order to establish this culture technique, the exact evaluation approach of allithiamin productivity is improper decision. However, it was difficult for the purification sample of allithiamin used as a standard substance for analysis at a present stage to come to hand, and exact evaluation of allithiamin productivity was difficult. Moreover, about the alliin which is the precursor of allithiamin, in order to change with the alliinase contained in a garlic to allysine etc. promptly, the technique which is stabilized out of a garlic and carries out separation purification of the alliin is not established.

**[0005]** This invention was made in view of the above-mentioned situation, and aims at offer of the approach of dissociating efficiently and easily and refining the alliin which is the precursor of allithiamin out of a garlic cell as a foundation for the establishment of an allithiamin production technology using a garlic cell.

**[0006]**

**[Means for Solving the Problem]** This invention is the process of the alliin equipped with the process heat-treated so that deactivation of the alliinase which puts in a raw material garlic into hot water, and contains it may be carried out, the process which crushes the heat-treated garlic, adds water and produces a garlic crude extract, and the process which carries out separation purification of the alliin and is isolated preparatively out of the above-mentioned garlic crude extract with the liquid chromatography

using an opposition system column.

[0007] Moreover, in the process of the above-mentioned alliin, it is desirable to perform the above-mentioned preparative isolation process, holding the above-mentioned garlic crude extract under an inert gas ambient atmosphere.

[0008]

[Function] It can extract efficiently, without the alliin in a raw material garlic decomposing by heat-treating so that deactivation of the alliinase which puts in a raw material garlic into hot water, and contains it may be carried out, crushing this, adding water, and producing a garlic crude extract. Moreover, only this liquid chromatography can refine alliin efficiently easily by isolating alliin preparatively from a garlic crude extract using the liquid chromatography using an opposition system column.

[0009]

[Example] Hereafter, this invention is explained to a detail. The process of the alliin by this invention is equipped with the process heat-treated so that deactivation of the alliinase which puts in a raw material garlic into hot water, and contains it may be carried out, the process which crushes the heat-treated garlic, adds water and produces a garlic crude extract, and the process which carries out separation purification of the alliin and is isolated preparatively out of the above-mentioned garlic crude extract with the liquid chromatography using an opposition system column. The garlic cell in which the raw material garlic used here is produced by cultivation articles, such as a commercial garlic (bulb section) and a stem, or the tissue culture method is used.

[0010] And a raw material garlic is heat-treated so that deactivation of the alliinase which puts in into hot water and is contained may be carried out. This heat treatment condition is desirably made into about 10 - 30 minutes into 80-100-degree C hot water. Since the alliinase in a raw material garlic deactivates and decomposition of alliin can be prevented by this heat treatment, it is possible to control decomposition of the alliin in future processes with time.

[0011] Subsequently, the heat-treated raw material garlic is crushed, water is added, alliin is extracted, and it considers as a garlic crude extract. A high performance mixer, a homogenizer, etc. are suitably used for crushing of this garlic. Moreover, as for the rate of the raw material garlic in a crude extract, it is desirable to consider as the range whose concentration of a raw material garlic is 1 - 20 % of the weight, and it is desirable to consider especially as about 5 % of the weight. A part for an insoluble fiber etc. is contained in the crushed garlic, and the liquid which added water and was stirred to the debris of a heat treatment garlic removes an insoluble element according to filtration or centrifugal separation. A garlic crude extract is put into a bottle, and fills inert gas, such as nitrogen gas, carbon dioxide gas, gaseous helium, and argon gas, and it is desirable to save desirably in a cool place 4 degrees C or less 25 degrees C or less.

[0012] Subsequently, the liquid chromatography using an opposition system column separates the garlic crude extract which removed the insoluble element, and separation purification of the alliin is carried out. As a column used here, it is the Du Pont opposition column, for example. ZORBAX TMS etc. is used suitably. When performing the chromatography of a garlic crude extract using this kind of opposition system column, after supplying a garlic crude extract to a column and making alliin stick to it, it is possible to obtain an alliin content fraction easily by separating pure water as an eluate and carrying out the monitor of the UV absorption coefficient of an eluate using the UV detector by making into measurement wavelength about 210nm which is the unique absorption wavelength of alliin.

[0013] Although a detail is described in the example of an experiment mentioned later when the liquid chromatography using an opposition system column separates a garlic crude extract, it is possible for other components except alliin to hardly exist in the outflow fraction of alliin, but to isolate purification alliin preparatively only with the liquid chromatography using an opposition system column.

[0014] Moreover, when carrying out this liquid chromatography and performing a continuation extensive aliquot, the garlic crude extract is unstable, and since there is a possibility of an insoluble element depositing by being carried out by being carried out into air, being easy to become cloudy, and causing decline in the separation efficiency of a column, a garlic crude extract is put into a bottle and



fills inert gas, such as nitrogen gas, carbon dioxide gas, gaseous helium, and argon gas. By this, nebula of a garlic crude extract can be prevented and a continuation aliquot becomes possible.

[0015] Thus, the process of the alliin by this invention produces alliin out of a raw material garlic by performing the process heat-treated so that deactivation of the alliinase which puts in a raw material garlic into hot water, and contains it may be carried out, the process which crushes the heat-treated garlic, adds water and produces a garlic crude extract, and the process which carries out separation purification of the alliin and is isolated preparatively out of a crude extract with the liquid chromatography using an opposition system column one by one. And it can extract efficiently, without making the alliin in a raw material garlic decompose by heat-treating so that deactivation of the alliinase which puts in a raw material garlic into hot water, and contains it may be carried out, crushing this, adding water, and producing a garlic crude extract. Moreover, purification alliin can be isolated preparatively only with this liquid chromatography by isolating alliin preparatively from a garlic crude extract using the liquid chromatography using an opposition system column. therefore -- according to this invention -- from the inside of a raw material garlic -- easy -- efficient -- and -- stable -- separation purification of alliin -- it can carry out.

[0016] (Example of an experiment) The process for extracting alliin efficiently out of a raw material garlic first was examined. The outline of the production process of the garlic crude extract in this example of an experiment was shown in drawing 1. After the garlic bulb of a raw material removed and carried out weighing capacity of the envelope, it was boiled and heat-treated by ebullition underwater for 15 minutes, homogenized this for 1 minute in 10000r.p.m., filtered it using the filter paper, set the volume of this filtrate at 100ml using pure water, and was taken as the garlic crude extract (heat treatment), as shown in this drawing. On the other hand, in order to compare with this, weighing capacity of the garlic which removed the envelope was carried out, and it homogenized for 1 minute in 10000r.p.m. as it is, and filtered using the filter paper, the volume of this filtrate was set at 100ml using pure water, and it considered as the garlic crude extract (processing [ no ]). These garlic crude extracts \*\*\*\*ed to concentration 5% of the weight. Moreover, each crude extract was saved in the cool place 4 degrees C or less.

[0017] Subsequently, the alliin in these crude extracts was analyzed using HPLC system BIP-1 (Jasco Corp. make). A column is the Du Pont opposition column ZORBAX. TMS (4.6mmx25cm) was used. This analysis condition is - temperature:25 degree C, flow rate:0.5 ml/min., eluate: pure water, and a detector: UV detector (measurement wavelength; 210nm).

It carried out. The alliin analysis result of these crude extracts was shown in drawing 2 and drawing 3.

[0018] Although the low broad peak appropriate for alliin was observed by no garlic crude extract processing ( drawing 3 ) at the heat-treated garlic crude extract ( drawing 2 ) to the peak which shows alliin having been clearly separated with other peaks as shown in drawing 2 and drawing 3, compared with what was heat-treated, the separation condition of alliin was poor. Furthermore, as for the non-processed thing, the peak of alliin decreased remarkably with the passage of time. By the non-processed thing, since alliinase remains in liquid, this is considered because alliin is decomposed with time. On the other hand, in what was heat-treated, reduction in alliin was hardly seen but the analysis result was stable. By performing heat treatment which boils a garlic about 15 minutes by ebullition underwater from this analysis result, matter which has a bad influence on separation of the alliin in the liquid chromatography using an opposition system column decreased in number sharply, and it became clear that the heat-treated crude extract could isolate purification alliin preparatively only by the separation purification actuation by the liquid chromatography which used the opposition system column.

[0019] Subsequently, the ultrafiltration of the above-mentioned garlic crude extract (heat treatment) was carried out, the same separation actuation as the liquid chromatography which used the previous opposition system column about the alliin in the filtrate was performed, and the separation condition of alliin was investigated. The result was shown in drawing 4 (a) - (d). in addition, the conditions of an ultrafiltration -- the transparency molecular weight range -- up to 100,000 molecular weight -- (-- up to drawing 4 (a)) and 50,000 molecular weight -- (-- up to ( drawing 4 (c)) drawing 4 (b)) and 30,000 molecular weight -- up to 10,000 molecular weight -- (-- they could be four sorts of drawing 4 (d)).

[0020] These drawing 4 (a) as a result of analyzing the filtrate which carried out the ultrafiltration as shown in - (d), in what performed the ultrafiltration to 100,000 - 50,000 molecular weight In what alliin was clearly separated as well as the case of a previous garlic crude extract (heat treatment), and performed the ultrafiltration to 30,000 to 10,000 molecular weight Although alliin was clearly separated as well as the case of a previous garlic crude extract (heat treatment), the peak of alliin became small, and loss of alliin became large when the ultrafiltration with small transparency molecular weight was performed. It was checked that it is possible to obtain purification alliin from these results efficiently with the liquid chromatography using an opposition system column using the crude extract from the heat-treated garlic even if it does not process a crude extract with an ultrafiltration method.

[0021] Subsequently, alliin was isolated preparatively from the garlic crude extract. HPLC system PX-8010 (TOSOH CORP. make) is used for the aliquot of an alliin fraction, and it is the opposition column ZORBAX for preparative isolation. Alliin was separated using TMS (9.4mmx25cm). The preparative isolation chromatogram of a garlic crude extract (heat treatment) was shown in drawing 5, and the preparative isolation chromatogram of a garlic crude extract (processing [ no ]) was shown in it at drawing 6. Although the peak of alliin was clearly separated when a garlic crude extract (heat treatment) was used as shown in drawing 5, the peak of alliin was not checked in the garlic crude extract (processing [ no ]) of drawing 6. Subsequently, it analyzed using HPLC system BIP-1 mentioned above about each peak fractions I, II, and III detected by the garlic crude extract (heat treatment) shown in drawing 5. These analysis results were shown in drawing 7 (a) - (c). Drawing 7 (a) As shown in - (c), it became clear from the holding time that the thing of an III fraction was alliin among three preparative isolation fractions checked by preparative chromatography. Furthermore, about the sample of this III fraction, as a result of carrying out GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry), the molecular weight of this preparative isolation fraction III is 177, and it checked that made a mistake and there was nothing to alliin ( drawing 8 ).

[0022] Moreover, the flow rate of the eluate at the time of isolating alliin preparatively using HPLC system PX-8010 (a column opposition column ZORBAX TMS 9.4mmfor preparative isolation x 25cm) was changed using the garlic crude extract (heat treatment), and the optimal flow rate for the aliquot of alliin was calculated. Drawing 9 (a) The result was shown in - (c). Drawing 9 (a) Although 0.5-1.5ml/min. was sufficient as the flow rate of the eluate at the time of isolating alliin preparatively from the result of - (c), when especially the flow rate was made into 0.5 - 1.0 ml/min. extent, the separation condition of alliin became good.

[0023] In order to stabilize alliin efficiently out of a raw material garlic and to carry out separation purification from the above experimental result, the garlic which heat-treated and deactivated alliinase was crushed and it became clear that the approach of carrying out separation purification of the alliin with the liquid chromatography [ this ] using a direct opposition system column is desirable using the garlic crude extract which extracted the alliin to contain. Moreover, the optimal preparative isolation conditions by the reversed phase method using HPLC in this example of an experiment were as follows.  
- temperature: -- 25 degree C and flow rate: -- 0.5 ml/min. and eluate: -- pure water and column: -- ZORBAX TMS (9.4mmx25cm)

- Detector : UV detector (measurement wavelength; 210nm)

Moreover, if the garlic crude extract is exposed into air when performing a continuation extensive aliquot in case alliin is isolated preparatively from a garlic crude extract (heat treatment), an insoluble element will deposit and it will be easy to produce nebula. The sample which became cloudy has a possibility of causing the bad influence of an insoluble element being accumulated in a column while the recovery of alliin gets worse. As a result of examining how to prevent nebula of this crude extract, it turned out that nebula is not produced even if it carries out long duration preservation, if air is not made to be touched with a crude extract. Nebula can be prevented by putting a crude extract into a carboy and specifically filling inert gas, such as nitrogen gas, gaseous helium, and argon gas. It became possible to be stabilized, to save a crude extract and to carry out continuation preparative isolation by this.

[0024]

[Effect of the Invention] The process of the alliin according to this invention as having explained above

produces alliin out of a raw material garlic by performing the process which heat-treats so that deactivation of the alliinase which puts in a raw material garlic into hot water, and contains it may be carried out, the process which crushes the heat-treated garlic, adds water and produce a garlic crude extract, and the process which carry out separation purification of the alliin and isolate preparatively out of the above-mentioned garlic crude extract with the liquid chromatography using an opposition system column one by one. And it can extract efficiently, without making the alliin in a raw material garlic decompose by heat-treating so that deactivation of the alliinase which puts in a raw material garlic into hot water, and contains it may be carried out, crushing this, adding water, and producing a garlic crude extract. Moreover, only this liquid chromatography can refine alliin efficiently easily by isolating alliin preparatively from a garlic crude extract using the liquid chromatography using an opposition system column. Therefore, according to this invention, separation purification of the alliin can be carried out easily efficiently and stably out of a raw material garlic.

---

[Translation done.]

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-220008

(43)公開日 平成6年(1994)8月9日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

C 0 7 C 317/48

315/06

識別記号

庁内整理番号

7419-4H

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平5-10239

(22)出願日 平成5年(1993)1月25日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年9月28日、  
中部化学関係学協会支部連合協議会発行の「第23回中部  
化学関係学協会支部連合秋季大会講演予稿集」に発表

(71)出願人 000000099

石川島播磨重工業株式会社

東京都千代田区大手町2丁目2番1号

(72)発明者 内山 茂

神奈川県横浜市磯子区新中原町1番地 石

川島播磨重工業株式会社技術研究所内

(72)発明者 鬼山 和彦

神奈川県横浜市磯子区新中原町1番地 石

川島播磨重工業株式会社技術研究所内

(72)発明者 関 昌夫

神奈川県横浜市磯子区新中原町1番地 石

川島播磨重工業株式会社技術研究所内

(74)代理人 弁理士 志賀 正武 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アリインの生産方法

(57)【要約】

【構成】 原料にんにくを熱水中に入れて含有されるアリイナーゼを失活させるように熱処理する工程と、熱処理したにんにくを破碎して水を加えてにんにく粗抽出液を作製する工程と、このにんにく粗抽出液を、逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィーによってアリインを分離精製して分取する工程とを順次行うことにより原料にんにく中からアリインを生産する。

【効果】 原料にんにくを熱水中に入れて含有されるアリイナーゼを失活させるように熱処理し、これを破碎して水を加えてにんにく粗抽出液を作製することにより、原料にんにく中のアリインを分解させることなく、効率よく抽出することができる。また、逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィーを用いてにんにく粗抽出液からアリインを分取することによって、この液体クロマトグラフィーのみでアリインを容易に効率よく精製することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 原料にんにくを熱水中に入れて含有されるアリイナーゼを失活させるように熱処理する工程と、熱処理したにんにくを破碎して水を加えてにんにく粗抽出液を作製する工程と、逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィーによって上記にんにく粗抽出液中からアリインを分離精製して分取する工程とを備えたことを特徴とするアリインの生産方法。

【請求項2】 上記にんにく粗抽出液を不活性ガス雰囲気下で保持しつつ、上記分取工程を行なうことを特徴とする請求項1記載のアリインの生産方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、にんにくに含まれる有用物質であるアリインの生産方法に関し、にんにく細胞から効率よく容易にアリインを分離、精製する技術に関する。

## 【0002】

【従来の技術】にんにくの細胞中で生産される物質の中で最も重要な物質の一つにアリチアミンがある。このアリチアミンはにんにく細胞中に含まれるアリインから合成される。即ち、この前駆物質のアリインが酵素アリイナーゼの作用によって中間物質のアリシンとなり、さらにアリシンとチアミン（ビタミンB1チオール型）とから、アリチアミン合成酵素の作用によってアリチアミンが合成される。

【0003】アリチアミンは、

- ①抗菌性作用：急性および慢性の伝染性胃腸炎、赤痢、チフスなどの殺菌作用、
- ②健胃作用：食欲増進・消化促進など健胃・整腸作用、
- ③循環器系作用：動脈硬化症、高血圧症、冷え性にも有効、
- ④発汗作用：発熱時の発汗作用、去炎・利尿硬化と解毒作用、
- ⑤強壮・強精作用：肉体疲労回復効果を持つことから強壮・強精、眼性疲労に効く、などの優れた薬理効果を有していることが知られ、その利用増大が図られている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】このアリチアミンを効率的ににんにくから生産するために、にんにくに培養細胞からアリチアミンを生産する培養法が検討されつつある。この培養技術を確認するためには、アリチアミン生産性の的確な評価方法が不可欠である。ところが現段階では分析のための標準試料として用いるアリチアミンの精製標本を入手するのが困難であり、アリチアミン生産性の的確な評価が難しかった。また、アリチアミンの前駆物質であるアリインについては、にんにく中に含まれるアリイナーゼによって速やかにアリシンなどに変化してしまうために、にんにく中から安定してアリインを分

離精製する技術が確立されていない。

【0005】本発明は上記事情に鑑みてなされたもので、にんにく細胞を用いたアリチアミン生産技術の確立のための基礎として、アリチアミンの前駆物質であるアリインをにんにく細胞中から効率よく容易に分離、精製する方法の提供を目的としている。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、原料にんにくを熱水中に入れて含有されるアリイナーゼを失活させるように熱処理する工程と、熱処理したにんにくを破碎して水を加えてにんにく粗抽出液を作製する工程と、逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィーによって上記にんにく粗抽出液中からアリインを分離精製して分取する工程とを備えたアリインの生産方法である。

【0007】また、上記アリインの生産方法においては、上記にんにく粗抽出液を不活性ガス雰囲気下で保持しつつ、上記分取工程を行なうことが望ましい。

## 【0008】

【作用】原料にんにくを熱水中に入れて含有されるアリイナーゼを失活させるように熱処理し、これを破碎して水を加えてにんにく粗抽出液を作製することにより、原料にんにく中のアリインが分解することなく、効率よく抽出することができる。また、逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィーを用いてにんにく粗抽出液からアリインを分取することによって、この液体クロマトグラフィーのみでアリインを容易に効率よく精製することができる。

## 【0009】

【実施例】以下、本発明を詳細に説明する。本発明によるアリインの生産方法は、原料にんにくを熱水中に入れて含有されるアリイナーゼを失活させるように熱処理する工程と、熱処理したにんにくを破碎して水を加えてにんにく粗抽出液を作製する工程と、逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィーによって上記にんにく粗抽出液中からアリインを分離精製して分取する工程とを備えている。ここで用いる原料にんにくは、市販のにんにく（球根部）や茎などの栽培品、或いは組織培養法によって生産されるにんにく細胞などが用いられる。

【0010】そして、原料にんにくは、熱水中に入れて含有されるアリイナーゼを失活させるように熱処理する。この熱処理条件は、望ましくは80～100℃の熱水中に10～30分程度とする。この熱処理によって原料にんにく中のアリイナーゼが失活し、アリインの分解を阻止し得るので、以後の工程でのアリインの経時的な分解を抑制することが可能である。

【0011】ついで、熱処理した原料にんにくを破碎し、水を加えてアリインを抽出してにんにく粗抽出液とする。このにんにくの破碎には、高性能ミキサーやホモジナイザー等が好適に用いられる。また、粗抽出液中の原料にんにくの割合は、原料にんにくの濃度が1～20

重量%の範囲とするのが好ましく、特に5重量%程度とするのが好ましい。破碎されたにんにくには不溶性繊維分などが含まれており、熱処理にんにくの破碎物に水を加え、攪拌した液は、ろ過或いは遠心分離によって不溶成分を取り除く。にんにく粗抽出液は瓶に入れ、窒素ガス、炭酸ガス、ヘリウムガス、アルゴンガスなどの不活性ガスを満たし、25℃以下、望ましくは4℃以下の冷暗所で保存するのが望ましい。

【0012】ついで、不溶成分を取り除いたにんにく粗抽出液を、逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィーによって分離し、アリインを分離精製する。ここで用いるカラムとしては、例えば、デュボン社製逆相カラム

ZORBAX TMS等が好適に用いられる。この種の逆相系カラムを用いてにんにく粗抽出液のクロマトグラフィーを行う場合には、カラムににんにく粗抽出液を供給してアリインを吸着させた後、純水を溶離液として分離し、UV検出器を用い、アリインの特異吸収波長である210nm程度を測定波長として溶離液のUV吸収率をモニタしておくことにより、アリイン含有フラクションを容易に得ることが可能である。

【0013】にんにく粗抽出液を、逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィーによって分離する場合には、後述する実験例に詳細を記すが、アリインの流出画分には、アリイン以外の他の成分が殆ど存在せず、逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィーのみで精製アリインを分取することが可能である。

【0014】また、この液体クロマトグラフィーを実施する場合において、連続大量分取を行う場合には、にんにく粗抽出液は不安定であり、空气中にされされることにより不溶成分が析出して白濁しやすく、カラムの分離効率の低下を招くおそれがあるので、にんにく粗抽出液は瓶に入れ、窒素ガス、炭酸ガス、ヘリウムガス、アルゴンガスなどの不活性ガスを満たしておく。これによってにんにく粗抽出液の白濁を防止でき、連続分取が可能となる。

【0015】このように、本発明によるアリインの生産方法は、原料にんにくを熱水中に入れて含有されるアリイナーゼを失活させるように熱処理する工程、熱処理したにんにくを破碎して水を加えてにんにく粗抽出液を作製する工程、及び逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィーによって粗抽出液中からアリインを分離精製して分取する工程とを順次行うことにより、原料にんにく中からアリインを生産する。そして原料にんにくを熱水中に入れて含有されるアリイナーゼを失活させるように熱処理し、これを破碎して水を加えてにんにく粗抽出液を作製することにより、原料にんにく中のアリインを分解させることなく、効率よく抽出することができる。また、逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィーを用いてにんにく粗抽出液からアリインを分取することによって、この液体クロマトグラフィーのみで精製アリイン

を分取することができる。従って、本発明によれば、原料にんにく中から容易に効率良く、しかも安定的にアリインの分離精製することができる。

【0016】(実験例) まず、原料にんにく中から効率よくアリインを抽出するためのプロセスについて検討した。図1に本実験例におけるにんにく粗抽出液の作製プロセスの概要を示した。この図に示す通り、原料のにんにく球根は外皮を剥いて秤量した後、15分間沸騰水中で煮沸して熱処理し、これを10000r.p.m.で1分間ホモジナイズし、濾紙を用いて濾過し、この濾液を純水を用いて100mlに定容し、にんにく粗抽出液(熱処理)とした。一方、これと比較するために、外皮を剥いたにんにくを秤量し、そのまま10000r.p.m.で1分間ホモジナイズし、濾紙を用いて濾過し、この濾液を純水を用いて100mlに定容し、にんにく粗抽出液(無処理)とした。これらのにんにく粗抽出液は5重量%濃度とした。また各粗抽出液は4℃以下の冷暗所に保存した。

【0017】ついで、これらの粗抽出液中のアリインをHPLCシステムBIP-1(日本分光株式会社製)を用いて分析した。カラムはデュボン社製逆相カラムZORBAX TMS(4.6mm×25cm)を用いた。

この分析条件は、

- ・温度: 25℃
- ・流量: 0.5ml/min.
- ・溶離液: 純水
- ・検出器: UV検出器(測定波長: 210nm)

とした。これら粗抽出液のアリイン分析結果を図2及び図3に示した。

【0018】図2及び図3に示した通り、熱処理したにんにく粗抽出液(図2)では、アリインを示すピークが他のピークと明瞭に分離されていたのに対し、にんにく粗抽出液無処理(図3)では、アリインらしき低く幅広いピークが観察されたが、熱処理したものと比べアリインの分離状態が不良であった。さらに、無処理のものは時間の経過とともにアリインのピークが著しく減少した。これは、無処理のものでは液中にアリイナーゼが残存しているため、アリインが経時的に分解されるためと考えられる。一方、熱処理したものではアリインの減少が殆ど見られず、分析結果は安定していた。この分析結果から、にんにくを沸騰水中で15分程度煮沸する熱処理を行うことによって、逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィーにおけるアリインの分離に悪影響を及ぼすような物質が大幅に減少し、熱処理した粗抽出液は逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィーによる分離精製操作のみで精製アリインを分取することが可能であることが判明した。

【0019】ついで、上記にんにく粗抽出液(熱処理)を限外濾過し、その濾液中のアリインについて、先の逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィーと同様の分

離操作を行ってアリインの分離状態を調べた。その結果を図4(a)~(d)に示した。なお、限外濾過の条件は透過分子量範囲が10万分子量まで(図4(a))、5万分子量まで(図4(b))、3万分子量まで(図4(c))及び1万分子量まで(図4(d))の4種とした。

【0020】これら図4(a)~(d)に示す通り、限外濾過した濾液を分析した結果、10万~5万分子量までの限外濾過を行ったものでは、先のろにんにく粗抽出液(熱処理)の場合と同じくアリインが明瞭に分離され、また、3万~1万分子量までの限外濾過を行ったものでは、先のろにんにく粗抽出液(熱処理)の場合と同じくアリインが明瞭に分離されたものの、アリインのピークが小さくなり、透過分子量が小さい限外濾過を行うとアリインの損失が大きくなった。これらの結果から、限外濾過法により粗抽出液の処理を行わなくとも、熱処理したろにんにくからの粗抽出液を用いて逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィーによって効率良く精製アリインを得ることが可能であることが確認された。

【0021】ついで、ろにんにく粗抽出液からアリインを分取した。アリイン画分に分取には、HPLCシステムPX-8010(東ソー株式会社製)を用い、分取用逆相カラムZORBAX TMS(9.4mm×25cm)を使ってアリインを分離した。図5に、ろにんにく粗抽出液(熱処理)の分取クロマトグラムを示し、図6に、ろにんにく粗抽出液(無処理)の分取クロマトグラムを示した。図5に示したように、ろにんにく粗抽出液(熱処理)を用いた場合にはアリインのピークが明瞭に分離されるが、図6のろにんにく粗抽出液(無処理)では、アリインのピークが確認されなかった。ついで図5に示したろにんにく粗抽出液(熱処理)で検出された各ピーク画分I、II、IIIについて、上述したHPLCシステムBIP-1を用いて分析した。これらの分析結果を図7(a)~(c)に示した。図7(a)~(c)に示したように、分取クロマトグラフィーによって確認された3つの分取画分のうち、保持時間からIII画分のものがアリインであることが判明した。さらに、このIII画分の試料について、GC-MS(ガスクロマトグラフィー質量分析)を実施した結果、この分取画分IIIの分子量は177でありアリインに間違い無いことを確認した(図8)。

【0022】また、ろにんにく粗抽出液(熱処理)を用い、HPLCシステムPX-8010(カラムには分取用逆相カラムZORBAX TMS 9.4mm×25cm)を用いてアリインを分取する際の溶離液の流量を変え、アリインの分取に最適な流量を求めた。図9(a)~(c)にその結果を示した。図9(a)~(c)の結果より、アリインを分取する際の溶離液の流量は0.5~1.5ml/min.でよいが、特に流量を0.5~1.0ml/min.程度にするとアリインの分離状態が良好となった。

【0023】以上の実験結果から、原料にんにく中からアリインを効率よく安定して分離精製するためには、熱処理してアリイナーゼを失活したろにんにくを破碎し、含有されるアリインを抽出したろにんにく粗抽出液を用い、これを直接逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィーによってアリインを分離精製する方法が望ましいことが判明した。また、本実験例におけるHPLCを用いた逆相法による最適分取条件は次の通りであった。

- ・温度: 25℃
- ・流量: 0.5ml/min.
- ・溶離液: 純水
- ・カラム: ZORBAX TMS(9.4mm×25cm)
- ・検出器: UV検出器(測定波長: 210nm)

また、ろにんにく粗抽出液(熱処理)からアリインを分取する際、連続大量分取を行う場合、ろにんにく粗抽出液を空气中にさらしていると、不溶成分が析出して白濁を生じ易い。白濁した試料はアリインの回収率が悪化するとともに不溶成分がカラムに蓄積するなどの悪影響を招くおそれがある。この粗抽出液の白濁を防止する方法について検討した結果、粗抽出液を空气中に触れさせなければ長時間保存しても白濁を生じないことが分かった。具体的には、粗抽出液をガラス瓶に入れ、窒素ガス、ヘリウムガス、アルゴンガスなどの不活性ガスを満たすことにより、白濁を防止し得る。これによって粗抽出液を安定して保存し、連続分取することが可能となった。

#### 【0024】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によるアリインの生産方法は、原料にんにくを熱水中に入れて含有されるアリイナーゼを失活させるように熱処理する工程と、熱処理したろにんにくを破碎して水を加えてろにんにく粗抽出液を作製する工程と、逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィーによって上記ろにんにく粗抽出液中からアリインを分離精製して分取する工程とを順次行うことにより原料にんにく中からアリインを生産する。そして原料にんにくを熱水中に入れて含有されるアリイナーゼを失活させるように熱処理し、これを破碎して水を加えてろにんにく粗抽出液を作製することにより、原料にんにく中のアリインを分解させることなく、効率よく抽出することができる。また、逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィーを用いてろにんにく粗抽出液からアリインを分取することによって、この液体クロマトグラフィーのみでアリインを容易に効率よく精製することができる。従って、本発明によれば、原料にんにく中から容易に効率良く、しかも安定的にアリインを分離精製することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る実験例におけるろにんにく粗抽出液の生産プロセスを説明するためのフロー図である。

50 【図2】粗抽出液(熱処理)のアリイン分析クロマトグ

ラムを示す図である。

【図3】粗抽出液（無処理）のアリイン分析クロマトグラムを示す図である。

【図4】粗抽出液を限外濾過した後の液のアリイン分析結果を示し、(a)は10万分子量用の限外濾過の透過液、(b)は5万分子量用の限外濾過の透過液、(c)は3万分子量用の限外濾過の透過液、(d)は3万分子量用の限外濾過の透過液のクロマトグラムを示す図である。

【図5】粗抽出液（熱処理）のアリイン分取クロマトグラムを示す図である。

【図6】粗抽出液（無処理）のアリイン分取クロマトグ

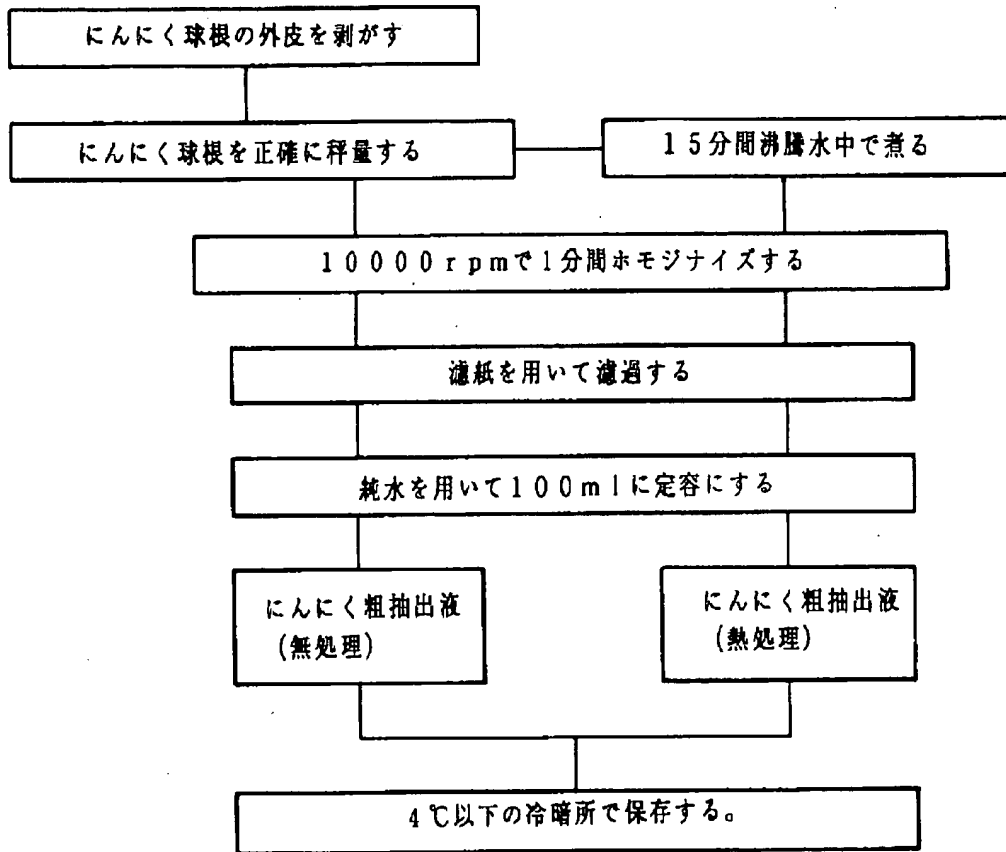
ラムを示す図である。

【図7】図5に示す画分I～IIIのアリイン分析結果を示し、(a)は分取画分I、(b)は分取画分II、(c)は分取画分IIIの分析クロマトグラムを示す図である。

【図8】分取画分IIIのGC-MS分析結果を示す図である。

【図9】粗抽出液（熱処理）のアリイン分取クロマトグラフにおける流量の変化とアリインの分離状態の関係を調べた結果を示し、(a)は流量0.5ml/min.、(b)は流量1.0ml/min.、(c)は流量1.5ml/min.とした時の分取クロマトグラムを示す図である。

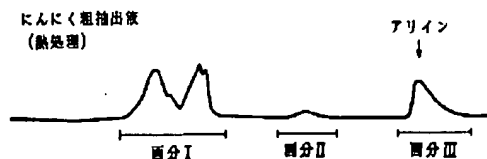
【図1】



【図3】

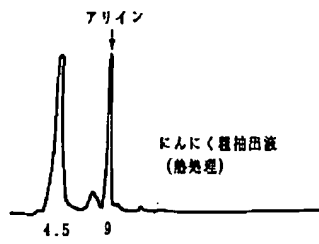


【図5】

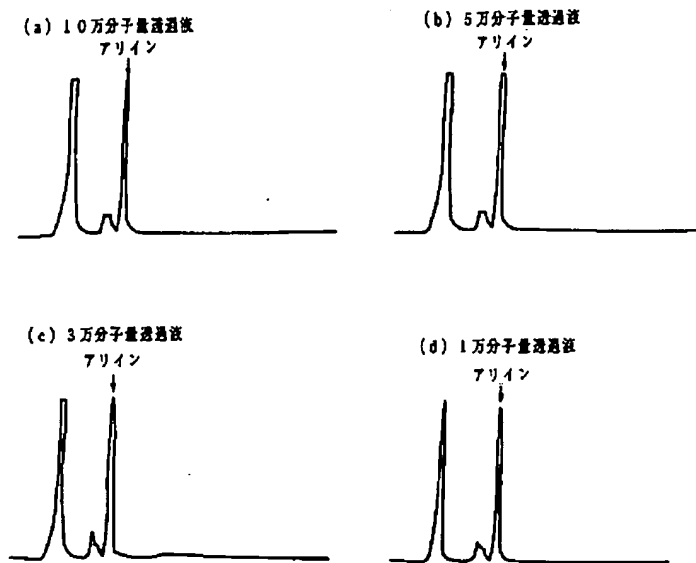




【図2】



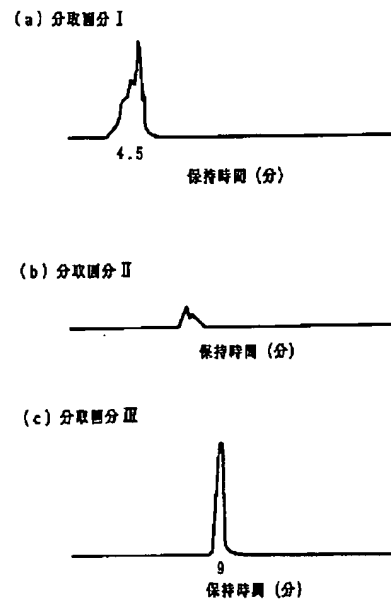
【図4】



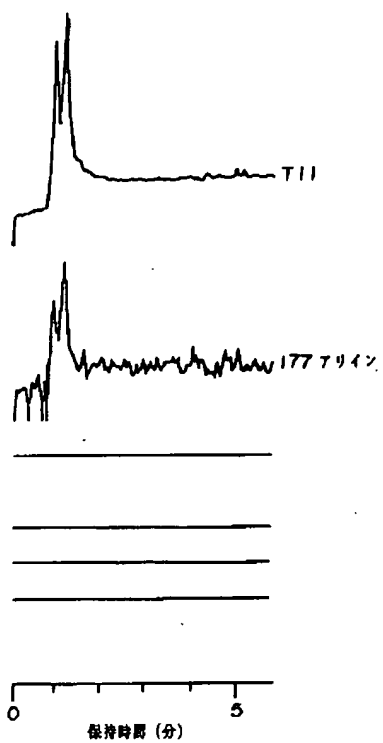
【図6】



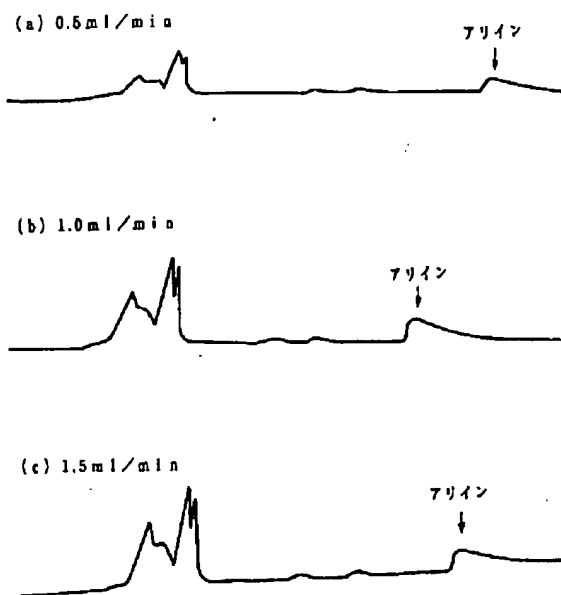
【図7】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(72)発明者 山下 正忠  
 神奈川県横浜市磯子区新中原町1番地 石  
 川島播磨重工業株式会社技術研究所内